

Sporadische Darmtumoren

Waltraut Friedl

Institut für Humangenetik
des Universitätsklinikums Bonn

Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich über 55.000 Menschen an Darmkrebs. Die Prognose der Erkrankung kann durch Früherkennung im Anfangsstadium entscheidend verbessert werden. Die Identifizierung der Gene, die bei hereditären Darmtumor Erkrankungen Mutationen aufweisen, hat einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der kolorektalen Tumorgenese geleistet. Kolorektale Karzinome (CRC) entwickeln sich über mehrere klinisch und histopathologisch definierte Tumorstadien (Adenom-Karzinom-Sequenz), die durch verschiedene genetische Veränderungen charakterisiert werden. Mutationen im Tumorsuppressor-Gen APC werden bereits in frühen Adenomen nachgewiesen und sind für die Tumorentstehung verantwortlich, während Mutationen im K-ras Protoonkogen, im p53-Gen und im DCC-Gen im weiteren Verlauf der Tumorentstehung festgestellt werden.

Etwa 15% der sporadischen CRC weisen einen Defekt im DNA-Mismatch-Reparatur-System auf. Charakteristisch für diese Tumoren sind insbesondere Mutationen in Genen mit kodierenden repetitiven DNA-Sequenzen (z.B. TGF β -RII-Gen) sowie auch in nichtkodierenden Bereichen des Genoms (Mikrosatellitensequenzen). Die Untersuchung von Tumorgewebe auf Mikrosatelliteninstabilität (MSI) kann einen Hinweis auf hereditäre Defekte des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems geben.

Basierend auf den Kenntnissen der genetischen Veränderungen im Tumorgewebe wurden in den letzten Jahren molekulargenetische Untersuchungen von Stuhlproben zur Früherkennung von Darmtumoren entwickelt. Die bislang besten Detektionsraten wurden mit einem kombinierten Test auf MSI sowie auf Mutationen in den Genen APC und p53 erzielt; mit diesen aufwendigen Tests konnten 91% der CRC und 73% der großen Adenome (>1cm) detektiert werden, ohne falsch positive Befunde. Für die Praxis ist der molekulargenetische Stuhltest noch nicht einsetzbar.

Trotz umfangreicher Studien zur molekulargenetischen Charakterisierung verschiedener kolorektaler Tumorstadien gibt es bisher für die Praxis keine eindeutige, darauf basierende Aussage für Prognose und Therapie. Die histomorphologische Charakterisierung der Tumoren bleibt zunächst die wesentliche Grundlage für die Diagnose, Prognose und Therapie. Hinzu kommt eine sorgfältige Eigen- und Familienanamnese. Das familiäre Auftreten von Tumoren sowie auch Erkrankungen in jungem Alter sollten den Kliniker an eine hereditäre Disposition denken lassen und ihn dazu veranlassen, Kontakte zu einer humangenetischen Beratungsstelle aufzunehmen.

Schlüsselwörter

Kolorektales Karzinom – Darmkrebs – Adenome – Stuhltest – Mikrosatelliteninstabilität

Sporadic colorectal cancer

Summary

In Germany 55000 new cases of colorectal cancer occur within a year and represent the second most frequent cause of death due to tumour disease. Early diagnosis can improve prognosis of the disease. Identification of genes that are mutated in hereditary colorectal tumour disposition have contributed to the understanding of colorectal tumorigenesis. Colorectal cancer (CRC) develops over many different clinically and histopathologically defined steps (adenoma – carcinoma – sequence). Tumour initiation and progression is based on accumulation of several genetic changes involving inactivation of tumour suppressor genes (APC, p53, DCC) and activation of protooncogenes (K-ras).

About 15% of sporadic CRC exhibit a defect in the DNA mismatch repair system. These tumours are characterized especially by mutations in genes containing coding repetitive sequences (e.g. TGF β -RII) or in non-coding parts of the genome (microsatellite sequences). Examination of apparently sporadic tumours for microsatellite instability (MSI) may point to a defect in DNA mismatch repair. MSI tests are provided by many laboratories as part of clinical practice.

During the last years a huge number of colorectal tumour tissues have been examined in order to find a correlation between specific cyto-

Tab 1 Hereditäre Dispositionen zu kolorektalen Karzinomerkrankungen

Tumordisposition	Gen	Chromosomale Region	Art des Gens
Familiäre Adenomatöse Polyposis	APC	5q21-q22	Tumorsuppressor-Gen
Hereditäres Kolorektales Karzinom ohne Polyposis (HNPCC)	MSH2 MLH1 MSH6 andere Gene	2p22-p21 3p21.3 2p22-p21	DNA-Mismatch-Reparatur-Gene
Peutz-Jeghers-Syndrom	STK11	19p13.3	Tumorsuppressor-Gen
Familiäre Juvenile Polyposis	MADH4 BMPR1A	18q21.1 10q22.3	Tumorsuppressor-Gen
Cowden-Syndrom	PTEN	10q23.3	Tumorsuppressor-Gen
Li-Fraumeni-Syndrom	p53	17p13.1	Tumorsuppressor-Gen

genetic or molecular changes and tumour stage, prognosis and drug response, and to develop sensitive noninvasive screening tests for early detection of tumours.

Preliminary results of molecular screening tests for detection of tumour DNA in stool samples demonstrate a higher specificity and sensitivity as the haemocult test currently used. By use of a combined test for MSI and mutations in APC and p53 genes 91% of CRC and 73% of large adenomas (>1cm) could be detected, with no false positive tests. However, these molecular tests are expensive and time consuming and thus not ready for clinical application. At present genetic changes in tumours cannot be applied as markers for prognosis and therapy, thus, careful histopathological characterization of tumours in addition to family history of tumour disease will be the basis for clinical management of the patients and their families. In cases of familial aggregation of tumours, or sporadic CRC in young patients the clinician should think of an inherited tumour disposition and contact a geneticist for appropriate counselling and molecular tests.

Keywords

Colorectal cancer; Adenoma fecal DNA test; Microsatellite instability

Einleitung

Mit über 55.000 Neuerkrankungen pro Jahr stellen kolorektale Karzinome (CRC) in Deutschland die zweithäufigste zum Tode führende Tumorerkrankung dar. Das Lebenszeitrisiko, an einem kolorektalen Karzinom (CRC) zu erkranken, liegt bei etwa 6%.

Die Prognose der Erkrankung hängt entscheidend von dem Tumorstadium, d.h. von der Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose ab. Die 5-Jahres-Überlebensrate bei Diagnose eines CRC im Tumorstadium I liegt bei 90%, während die 5-Jahres-Überlebensrate im metastasierten Stadium nur etwa 6% beträgt. Die Beurteilung der anatomischen Tumorausbreitung erfolgt nach der TNM-Klassifikation (T – lokale Ausbreitung des Primärtumors; N – regionaler Lymphknotenstatus; M – Fernmetastasen) und wird durch das zytologische Grading ergänzt. Im anglo-amerikanischen Raum ist auch die Dukes-Klassifikation gebräuchlich (Übersicht in Schulmann und Schmiegel, 2002).

Darmtumoren sind vorwiegend im Kolon und seltener im Dünndarm lokalisiert. Die Häufigkeit des CRC nimmt mit dem Alter zu. Die Mehrzahl der Karzinome tritt nach dem 50. Lebensjahr (in den USA im Durchschnitt mit 67 Jahren) auf. Darmtumoren im Alter unter 40 Jahren sind in Deutschland selten und weisen auf eine mögliche erbliche Tumordisposition hin. Etwa 5-10% der Darmtumoren beruhen auf einer autosomal-dominant vererbten Tumordisposition, die durch eine

Keimbahnmutation in einem Tumorsuppressor-Gen oder in einem DNA-Mismatch-Reparatur-Gen verursacht wird (Tabelle 1).

Die Untersuchung von Keimbahnmutationen bei Familien mit hereditärer Tumordisposition wurde bereits in die diagnostische Praxis umgesetzt: Die molekulargenetische Früherkennung von Anlageträgern und deren Einbindung in spezielle Krebsvorsorgeprogramme ist heute Bestandteil der klinischen Versorgung.

Die Entdeckung der genetischen Grundlagen für hereditäre Tumordispositionen haben wesentlich zum Verständnis der Tumorgenese der viel häufiger auftretenden sporadischen Tumoren beigetragen. Somatische Mutationen in den gleichen Genen sind auch für die Entstehung sporadischer CRC verantwortlich. Angesichts der vielen Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen an Darmtumoren stellt sich die Frage, inwieweit die Erkenntnisse dieser Untersuchungen für die Diagnostik und Therapie sporadischer CRC relevant sind.

Zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen beim sporadischen CRC

Darmtumoren gehören zu den am besten untersuchten soliden Tumoren, da man sie bereits in frühen Stadien erkennen, entfernen und dann analysieren kann. Bei der Darstellung der umfangreichen Daten wurden insbesondere die Aspekte herausgegriffen, die für die praktische Anwendung von Bedeutung sind.

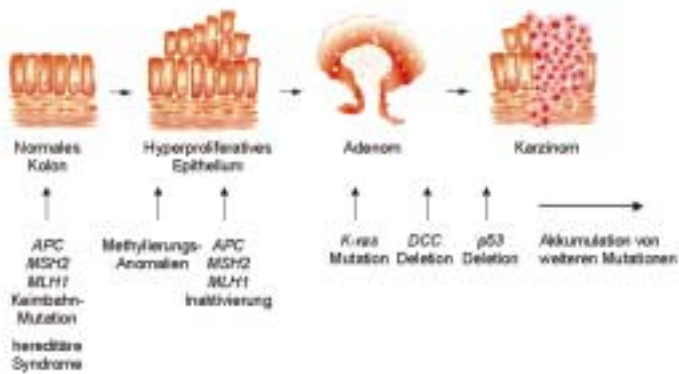


Abb 1 Adenom-Karzinom-Sequenz. Schematische Darstellung der häufigsten molekulargenetischen Veränderungen bei der kolorektalen Tumorgenese im Stufenmodell von Vogelstein (modifiziert nach Toribara und Sleisenger, 1995).

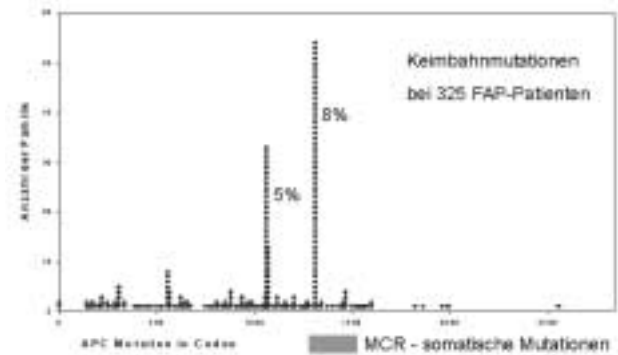


Abb 2 Verteilung der Keimbahnmutationen im APC-Gen bei 325 von 680 Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis (modifiziert nach Friedl et al., 2001).

Somatische Mutationen in Darmtumoren treten vorwiegend in der „Mutation cluster region“ (MCR), im Bereich zwischen Codon 1286-1513 auf.

Adenom – Karzinom – Sequenz

Kolorektale Tumoren entwickeln sich über mehrere klinisch und histopathologisch definierte Tumorstadien, beginnend mit ersten Läsionen in einzelnen Darmkrypten (sog. dysplastische Foci aberranter Krypten) über benigne Tumoren (adenomatöse Polypen) zu Karzinomen. Diesem seit lange auch als Adenom – Karzinom – Sequenz bekannten histomorphologischen Progressionsmodell liegen bestimmte genetische Veränderungen zugrunde, die erstmals 1988 von Vogelstein aufgedeckt wurden (Abb. 1). Genetische Veränderungen in Tumoren sind Ausdruck einer genomischen Instabilität, die sich sowohl auf chromosomaler Ebene (chromosomale Instabilität) als auch durch Punktmutationen (Defekte in DNA-Reparatur-Systemen) manifestieren kann.

Zytogenetische Untersuchungen verschiedener Tumorstadien haben gezeigt, dass Verluste der chromosomalen Abschnitte 5q, 8p, 17p und 18q sehr häufig sind. Die Befunde der Akkumulation zytogenetisch detektierbarer Veränderungen wurden durch die molekulargenetische Untersuchung von polymorphen Markern aus den betreffenden chromosomalen Regionen bestätigt, und zwar durch den Nachweis von Allelverlusten der polymorphen Marker im Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe (LOH = loss of heterozygosity). Später wurden in den entsprechenden Genregionen die hier vermuteten Tumorsuppressor-Gene identifiziert. Im Folgenden werden die wichtigsten genetischen Veränderungen während

der kolorektalen Tumorgenese kurz dargestellt. Eine ausführliche Beschreibung der molekulargenetischen Befunde beim sporadischen CRC ist in verschiedenen Übersichtsarbeiten zusammengestellt (Kinzler und Vogelstein, 1998; Schulmann und Schmiegel, 2002).

Mutationen im Tumorsuppressor-Gen APC (Chromosomenarm 5q)

Verluste des Chromosomenabschnittes 5q bzw. die Inaktivierung des hier lokalisierten Tumorsuppressor-Gens APC gehören zu den ersten genetischen Veränderungen, da sie bereits in frühen Adenomen festgestellt wurden (Abb. 1). Etwa 30-40% der Adenome sowie auch der gleiche Prozentsatz der CRC weisen 5q-Verluste auf, ein weiterer, beträchtlicher Teil dieser Tumoren weist inaktivierende Punktmutationen im APC-Gen auf. Das APC-Gen kodiert für ein Protein von 2843 Aminosäuren.

Keimbahnmutationen im APC-Gen sind die Ursache der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP), einer Präkanzerose mit der höchsten Disposition zu Darmkrebs (Übersicht in Friedl und Jungck, 1998). In Adenomen von FAP-Patienten ist das zweite APC-Allel häufig durch LOH oder eine somatische Punktmutation inaktiviert. Während die Keimbahnmutationen bei FAP vorwiegend über die erste Hälfte des Gens verstreut sind, liegen die somatischen Mutationen meist in einer sog. „mutation cluster region“, zwischen den Codons 1286 – 1513 (Abb. 2). Sowohl die Keimbahnmutationen als auch die somati-

schen Mutationen führen in 95% der Fälle zu einem vorzeitigen Stop-Codon.

Das APC-Protein ist Teil eines komplexen Regelkreises, der die Zellproliferation und Zelladhäsion sowohl von Einzelzellen als auch von epithelialen Zellverbänden steuert. Durch Interaktion mit β -Catenin, einem wesentlichen Bestandteil des Zelladhäsionskomplexes, ist das APC-Protein an der Vermittlung von Signalen zwischen Zelladhäsionsmolekülen der Zelloberfläche (E-Cadherin) und Zellkern (Mikrotubuli) beteiligt. Normales APC-Protein steuert den Abbau von β -Catenin; mutiertes APC führt zur Erhöhung des β -Cateninspiegels in der Zelle und in der Folge zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern und zu unkontrolliertem Zellwachstum.

Ras-Onkogene (Chromosomenarm 12p)

Ras-Protonkogene kodieren für 21 kD-Proteine, die Homologie zu G-Proteinen haben und – ebenso wie diese – die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysieren. Die GTPase-Aktivität des ras-Proteins wird durch dessen Interaktion mit einem zellulären GTPase-aktivierenden Protein (GAP) stimuliert. Punktmutationen in *K-ras* und *N-ras* Onkogenen wurden in etwa 50% der großen (>1cm) Adenome und etwa 50% der CRC festgestellt. Hingegen wurden *ras*-Mutationen nur selten in frühen Adenomen (<1cm) beobachtet. Dieses spricht dafür, dass *ras*-Mutationen hauptsächlich bei der Tumorprogression eine Rolle

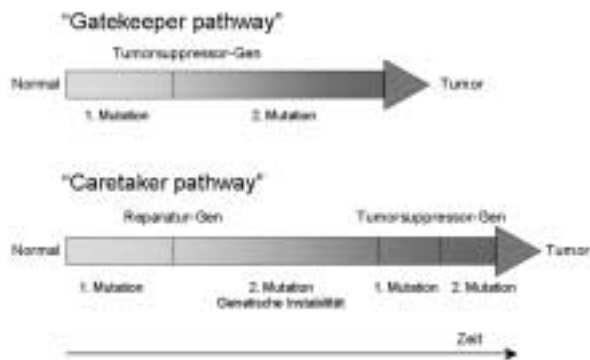


Abb 3 Mechanismen der Tumorgenese durch Mutationen in Tumorsuppressor-Genen und DNA-Reparatur-Genen (modifiziert nach Kinzler und Vogelstein, 1997).

Tumorsuppressor-Gene (TS) haben eine direkte Schlüsselfunktion bei der Regulation des Zellwachstums („gatekeeper“). Beide Allele des TS-Gens müssen in einer Zelle inaktiviert werden, um das Tumorwachstum zu initiieren (2-Treffer-Hypothese von Knudson). Bei Patienten mit einer Keimbahnmutation in einem TS-Gen ist nur *eine* zusätzliche Mutation in einer Zelle erforderlich; diese Patienten haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein >1000-fach erhöhtes Krebsrisiko.

Die Inaktivierung beider Allele eines Reparatur-Gens („caretaker“) führen nicht direkt zur Auslösung der Tumorgenese, sondern zunächst zu einer genetischen Instabilität. Diese beschleunigt jedoch die Akkumulierung weiterer Mutationen. Bei Patienten mit einer Keimbahnmutation in einem Reparatur-Gen sind noch drei zusätzliche Mutationen in einer Zelle erforderlich; sie haben ein 5-50-fach erhöhtes Krebsrisiko.

spielen. *K-ras*-Mutationen treten nicht nur in dysplastischen kolorektalen Läsionen (Adenome, Karzinome), sondern auch in 100% der nichtdysplastischen Foci aberranter Krypten und in 25% der hyperplastischen Polypen auf. Diese nichtdysplastischen Läsionen scheinen jedoch keine klinische Bedeutung zu haben.

Über 85% der Mutationen sind Basenaustausche in den Codons 12 und 13 des *K-ras* Gens, die restlichen Mutationen betreffen Codon 61 von *K-ras* und *N-ras*. In allen Fällen handelt es sich um Missense-Mutationen; mutiertes ras-Protein kann nicht mit GAP interagieren und hat daher eine geringere GTPase-Aktivität, die in einem geringeren Umsatz von GTP zu GDP resultiert.

DCC, MADH4 (Chromosomenarm 18q)

Verluste einer Kopie der chromosomalen Region 18q wurden in 70-75% der sporadischen CRC und in 45-70% der großen Adenome festgestellt. 18q-Verluste in kleinen Adenomen sind hingegen selten. In dieser Region liegt das *DCC*-Gen (deleted in colorectal cancer). *DCC* kodiert für ein 1447 Aminosäuren großes Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne Homologie zum Zelladhäsionsmolekül N-CAM aufweist. Punktmutationen im *DCC*-Gen wurden in CRC nur selten gefunden, da die Region meist ganz deletiert ist.

In der gleichen chromosomalen Region liegt auch das *MADH4*-Gen (auch als *DPC4* – deleted in pancrea-

tic cancer – oder *SMAD4* bezeichnet). *MADH4* kodiert für ein 552 Aminosäuren großes, evolutionär hochkonserviertes Protein, welches im Signaltransduktionsweg der TGF β -Superfamilie eine Rolle spielt.

Keimbahnmutationen im *MADH4*-Gen wurden bei etwa 25% der Patienten mit Familiärer Juveniler Polyposis festgestellt. *MADH4*-Mutationen werden auch in 10-16% der sporadischen CRC nachgewiesen. Ein weiteres Gen aus dem TGF β -Transduktionsweg (*BMPR1A*) weist ebenfalls Keimbahnmutationen bei etwa 20% der Patienten mit Familiärer Juveniler Polyposis auf. Die Keimbahnmutationen sind jeweils über das ganze Gen verstreut.

p53-Gen (Chromosomenarm 17p)

Zytogenetische Untersuchungen und später LOH-Studien zeigten bei 75% der CRC einen Verlust der chromosomalen Region 17p, während in kolorektalen Adenomen nur selten ein Verlust von 17p beobachtet wurde. Neben LOH werden in Tumoren häufig Missense-Mutationen in bestimmten Regionen des *p53*-Gens (Exons 5-8) nachgewiesen. Mutationen im *p53*-Gen werden nicht nur beim CRC sondern auch bei mehr als der Hälfte aller Tumorentitäten weltweit gefunden.

Das *p53*-Gen kodiert für ein 393 Aminosäuren großes (53 kD) Phosphoprotein. Das *p53*-Protein ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der als „Wächter des Genoms“ eine Schlüsselrolle an der Zellzykluskon-

trolle und damit an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität hat. Keimbahnmutationen im *p53*-Gen führen zu dem sehr seltenen Li-Fraumeni-Syndrom, welches durch eine erhöhte Neigung zu Leukämie, Brustkrebs, Weichteilsarkomen, Hirntumoren und Osteosarkomen gekennzeichnet ist.

Serin-Threonin-Kinase STK11 (Chromosomenarm 19p)

Das Peutz-Jeghers-Syndrom (PJS) wird durch eine Keimbahnmutation in der Serin-Threonin-Kinase *STK11* (auch *LKB1* bezeichnet) verursacht. Das Gen wurde durch moderne zytogenetische Methoden (vergleichende Genomhybridisierung, CGH an Peutz-Jeghers-Polypen) in Verbindung mit der genetischen Kopplungsanalyse auf Chromosom 19p13 kartiert. Bei etwa 60% der PJS-Patienten wird eine Keimbahnmutation im *STK11*-Gen gefunden. Beim sporadischen CRC werden *STK11*-Mutationen jedoch nur sehr selten beobachtet.

Defekte in der DNA-Mismatch-Reparatur

In der normalen Zelle werden Fehler, die bei der DNA-Replikation auftreten, durch das Zusammenspiel mehrerer Proteine (kodiert durch die Mismatch-Reparatur-Gene *MSH2*, *MLH1*, *MSH6*, *PMS2*, *PMS1* u.a.) erkannt und korrigiert. Keimbahnmutationen in einem dieser Gene werden bei Patienten mit hereditärem kolorektalem Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) festgestellt (Übersicht siehe Holinski-Feder, 1998). HNPCC-Tumoren sind häufiger im proximalen Kolon lokali-

siert, und es werden vermehrt synchrone oder metachrone Tumoren beobachtet. HNPCC-Patienten entwickeln neben CRC auch häufig Tumoren in anderen Organen (insbesondere Endometrium, Urothel, oberer Gastrointestinaltrakt). Über 90% der Tumoren von HNPCC-Patienten und 15% der sporadischen CRC weisen eine sogenannte Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) auf, d.h. eine Veränderung in kurzen repetitiven DNA-Sequenzen. Ursache der Instabilität ist eine Inaktivierung des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems, die sowohl auf genetische Veränderungen (Mutationen) als auch – insbesondere bei sporadischen MSI-Tumoren – auf epigenetische Veränderungen (z.B. Methylierung des Promotorbereichs) zurückgeht. MSI in Tumoren kann durch den Vergleich von Mikrosatelliten-DNA in Tumor- und Normalgewebe untersucht werden.

Genetische oder epigenetische Veränderungen in DNA-Mismatch-Reparatur-Genen führen nicht nur zu Mutationen in Mikrosatellitensequenzen, sondern auch zu einer erhöhten Mutationsrate in verschiedenen Genen. Zu den ersten genetischen Veränderungen in MSI-Tumoren gehören Mutationen im Wachstumsfaktor *TGF β -RII*, der aufgrund seiner repetitiven Gensequenz besonders anfällig für Mutationen ist. In der weiteren Tumorigenese sind Mutationen in den gleichen Genen involviert wie bei mikrosatellitenstabilen Tumoren, jedoch sind die Abläufe viel schneller.

Diskussion

Durch die Identifizierung der genetischen Grundlagen hereditärer kolorektaler Karzinomerkrankungen wurden neue Tumorsuppressor-Gene entdeckt (z.B. *APC*, *STK11*, *MADH4*). Molekulargenetische Untersuchungen von Darmtumoren haben das bereits 1988 von Vogelstein postulierte Stufenmodell der kolorektalen Tumorigenese bestätigt und ergänzt (Abb. 1). Ursache für die Tumorentstehung ist die Akkumulierung mehrerer somatischer Mutationen in Tumorsuppressor-Genen und Protoonkogenen in der gleichen Zelle. Veränderungen in DNA-Reparatur-Genen und im *APC*-

Gen stehen dabei häufig am Anfang der Kaskade.

Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen unterstützen das Konzept der klonalen Evolution von kolorektalen Tumoren: Durch die Mutation in einem Tumorsuppressor-Gen erhält eine Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den benachbarten Zellen. Eine zweite Mutation in einer dieser Zellen verleiht dieser wiederum einen noch größeren Wachstumsvorteil, der zur weiteren klonalen Expansion dieser Zelle führt. Weitere Mutationen gefolgt von klonaler Expansion der betreffenden Zellen führen zur Akkumulation zahlreicher genetischer Veränderungen und damit zu Krebs.

Das Stufenmodell der kolorektalen Tumorigenese wurde durch das Gatekeeper/Caretaker Konzept (Kinzler und Vogelstein, 1997) ergänzt, welches wesentlich zum Verständnis der kolorektalen Tumorigenese und Tumorigenese sporadischer und hereditärer CRC beigetragen hat (Abb. 3). Tumorsuppressorgene (z.B. *APC*) haben eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Zellproliferation („Gatekeeper“); ein Ausfall dieser Funktion in einer Zelle (durch Mutationen in beiden Allelen des betreffenden Gens) hat einen unmittelbaren Einfluss auf die Zellteilung. Mutationen in beiden Allelen eines DNA-Reparatur-Gens („Caretaker“) haben in der Regel keine direkte Auswirkung auf das Zellwachstum. Der Ausfall der DNA-Reparatur-Funktion führt jedoch zu einer erhöhten genomischen Instabilität und in der Folge zu einer raschen Akkumulation von Mutationen in vielen verschiedenen Genen, darunter auch in Tumorsuppressor-Genen. Erst wenn beide Allele eines Tumorsuppressor-Gens in einer Zelle inaktiviert werden, kommt es zum unkontrollierten Zellwachstum. Durch die erhöhte Mutationsrate auch in anderen Genen wachsen die einmal initiierten Tumoren sehr schnell.

Seit der Identifizierung der Gene, die in sporadischen CRC Mutationen aufweisen oder durch chromosomale Veränderungen ganz verloren gegang-

gen sind, wurden unzählige Tumorenproben verschiedener Stadien untersucht. Wesentliches Ziel dieser Untersuchungen ist, spezifische zytogenetische oder molekulargenetische Veränderungen im Tumor einerseits mit dem Tumorstadium, der Prognose und Ansprechbarkeit auf Chemotherapie in Verbindung zu bringen und andererseits für eine spezifische, nichtinvasive Früherkennung zu nutzen.

Angesichts der Fülle von Daten aus Untersuchungen an verschiedenen sporadischen und hereditären kolorektalen Tumoren stellt sich die Frage, welche Bedeutung die molekulargenetische Untersuchung somatischer Mutationen in sporadischen CRC für die Klinik hat. Bisher gibt es insbesondere im Bereich der Diagnostik vielversprechende Ansätze.

Differentialdiagnosen für hereditäre Tumorsyndrome

Generell ist die Untersuchung von Tumorgewebe für die Identifizierung der erblichen Disposition für eine Tumorerkrankung (z.B. FAP) nicht geeignet, da im Tumor auch zahlreiche somatische Mutationen auftreten. Eine Ausnahme bildet die Untersuchung von Tumoren auf das Vorliegen von Mikrosatelliten-Instabilität – eine Routine-Untersuchung, die bereits in verschiedenen Labors durchgeführt wird und einen Hinweis auf Defekte im DNA-Mismatch-Reparatur-System geben kann. Bei Patienten mit familiärer Häufung von CRC oder bei Patienten mit scheinbar sporadischem CRC im Alter <45 Jahren sollte an eine hereditäre Form (HNPCC) gedacht und diese Untersuchung durchgeführt werden. Es empfiehlt sich, in diesem Falle Kontakt zu einer humangenetischen Beratungsstelle aufzunehmen, bevor die Untersuchung veranlasst wird. Für die anderen hereditären Tumorsyndrome liefert insbesondere die pathomorphologische Charakterisierung der Tumoren die Voraussetzung für eine gezielte molekulargenetische Differentialdiagnostik.

Nur durch den Nachweis einer Keimbahnmutation (z.B. in einem der in Tab. 1 aufgeführten Gene) kann das

Vorliegen einer hereditären Tumordisposition bewiesen werden. Ein Ausschluss eines solchen Syndroms ist jedoch nicht möglich, wenn keine Mutation gefunden wurde, da einerseits die Methoden keine 100%-ige Mutationsdetektion erlauben, andererseits auch Mutationen in anderen, bislang noch nicht identifizierten Genen vorliegen können.

Früherkennung von Tumoren mit molekulargenetischen Methoden

Die bisher angewandte Screeninguntersuchung der asymptomatischen Bevölkerung auf okkultes fäkales Blut (Hämocult-Test) kann die Mortalität durch CRC um 16-23% senken. Der Test ist einfach durchführbar und billig, aber er liefert in 5-10% der Fälle falsch-positive Ergebnisse, die zu unnötigen und teuren Koloskopien führen. Außerdem wird ein beträchtlicher Teil der Tumoren nicht erkannt. Die Kenntnis der molekulargenetischen Veränderungen im Tumorgewebe und die Verfeinerung der Untersuchungsmethoden sind die Grundlage für die Entwicklung von hochsensitiven und spezifischen Tests für die Frühdiagnose eines kolorektalen Tumors. Hierfür wurden bereits verschiedene Strategien verfolgt, deren Grundlage und Grenzen im Folgenden kurz aufgelistet werden sollen:

Alle diese Methoden basieren auf der Extraktion von menschlicher DNA aus Stuhlproben, wobei man davon ausgeht, dass Zellen von Darmtumoren mit dem Stuhl ausgeschieden werden. Es gilt, diese menschliche DNA, die nur etwa 0,5-5% der gesamten, aus Stuhlproben isolierten DNA ausmacht, zu extrahieren und darin die mutierte DNA, die ihrerseits wiederum nur einen Bruchteil der normalen DNA ausmacht, zu detektieren.

Die Untersuchung von K-ras-Mutationen in Stuhlproben ist besonders attraktiv, da mehr als 90% der K-ras-Mutationen in den Codons 12, 13 und 61 auftreten. Für den gezielten Nachweis dieser Mutationen wurden verschiedene Techniken entwickelt, bis hin zu einem automatisierten Microarray-basierten Verfahren (Prix et al. 2002): nach selektiver, mutationsspe-

zifischer Amplifikation der DNA konnten die Autoren in Stuhlproben von 40-50% der untersuchten Tumorpatienten eine K-ras-Mutation nachweisen. In Kontrollproben von Gesunden wurde keine Mutation festgestellt, d.h. die Spezifität des Tests ist besser als die des Hämocult-Tests (keine falsch-positiven Ergebnisse). Es werden aber nur etwa die Hälfte der Karzinome erkannt. Auch große Adenome (>1cm) konnten nicht diagnostiziert werden.

Die Untersuchung der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) in Stuhlproben wurde insbesondere für die Detektion proximal lokalisierter Kolonkarzinome propagiert, die mittels Rektosigmoidoskopie nicht erfasst werden können. Auch hierbei ist von Vorteil, dass ein einziger Mikrosatellitenmarker (der Mononukleotid-Repeat-Marker BAT 26) >90% der instabilen Tumoren erkennt. Nach aufwendiger, sequenzspezifischer Extraktion der DNA aus Stuhlproben (durch Hybridisierung an Oligonukleotide vom BAT26-Locus) und Untersuchung von BAT26 mit Hilfe einer sog. Digital-PCR-basierten Methode konnten die Autoren bei 17 von 46 Patienten mit proximal lokalisiertem Kolonkarzinom (37%) eine MSI in Stuhlproben nachweisen. Die Untersuchung der Tumoren hatte bei 18 der 46 Patienten eine MSI nachgewiesen, von denen 17 durch Untersuchung der Stuhlproben erkannt wurden (Traverso et al. 2002b). Auch dieser Test hat eine hohe Spezifität (100%), kann aber Adenome (auch >1cm) nicht erkennen. Von Nachteil ist auch, dass nur etwa 15% aller sporadischen CRC, bzw. etwa 30-40% der proximalen Kolonkarzinome MSI aufweisen.

Mit einer ähnlichen Technik hat die gleiche Arbeitsgruppe auch Mutationen im APC-Gen in Stuhlproben nachgewiesen (Traverso et al. 2002a). Da APC-Mutationen bereits in frühen Tumoren auftreten, wurden mit diesem Test 50% der Adenome >1cm, sowie 61% der Dukes B-Tumoren erkannt. Zum Mutationsnachweis wurde die APC-Sequenz zwischen den Codons 1210-1581 (welche die „mutation cluster region“ einschließt; sie-

he Abb. 2) mittels Protein-Trunkationstest (PTT) untersucht.

Die Untersuchung von p53-Mutationen allein hat an Attraktivität verloren, da es in diesem Gen viele verschiedene Mutationen gibt, und p53-Mutationen zudem erst in einem späteren Tumorstadium auftreten. Ein kombinierter Test auf MSI und Mutationen in mehreren Genen (APC, p53) konnte 91% der CRC und 73% der Polypen >1cm detektieren, ohne falschpositive Ergebnisse (Kommentar von Stephenson, 2000). Zur Validierung dieses kombinierten molekulargenetischen Stuhltests läuft seit Januar 2001 eine dreijährige, vom NCI unterstützte Studie in den USA.

Die bisher publizierten molekulargenetischen Stuhltests sind alle aufwändig und daher für den Einsatz in der klinischen Praxis noch nicht geeignet (Schwarz, 2002). Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese Methoden weiter optimiert und automatisiert werden. Ein Weg dahin ist z.B. der Einsatz von Mikroarrays, mit denen gleichzeitig mehrere Gene und mehrere Mutationen in diesen Genen getestet werden können. Selbst wenn der molekulargenetische Stuhltest teurer bleibt als der Hämocult, könnte er insgesamt Kosten sparen, da unnötige Koloskopien aufgrund falschpositiver Tests entfallen. Auch ein optimierter molekulargenetischer Stuhlprobentest wird die Koloskopie nicht ersetzen; er kann jedoch die Patienten, bei denen eine Koloskopie durchgeführt werden sollte, besser vorselektieren als dies jetzt mit dem Hämocult-Test möglich ist. Außerdem könnte er als Screening für Risikogruppen eingesetzt werden. Wichtig ist auch, dass aufgrund der höheren Sensitivität ein hoher Prozentsatz von großen Polypen erkannt werden kann; dadurch ist eine tatsächliche Krebsverhinderung durch Früherkennung möglich und es werden weniger Resektionen aufgrund von Darmkrebs erforderlich.

Prognose und Therapie

Zahlreiche Untersuchungen von molekulargenetischen Veränderungen in Tumoren – insbesondere von K-ras

und *p53* – haben widersprüchliche Ergebnisse bezüglich einer Aussage für Prognose und Therapie erbracht. Solange hierfür keine spezifischen Marker gefunden werden, ist für die Praxis das klinisch-pathologische Staging der entscheidende Prognosefaktor nach kurativer Resektion des Kolonkarzinoms. Das pathohistologisch definierte Tumorstadium stellt auch das ausschließliche Kriterium für die Indikationsstellung zu einer adjuvanten Chemotherapie bei Vorliegen eines Kolonkarzinoms dar (Graeven und Schmiegel, 2000).

Ausblick

Auch in nächster Zukunft wird die histomorphologische Charakterisierung der Darmtumoren eine wesentliche Voraussetzung für die Diagnose, Prognose und Therapie darstellen. Hinzu kommt eine sorgfältige Eigen- und Familienanamnese. Eine familiäre Häufung von Tumoren oder das Auftreten eines sporadischen CRC bei einem jungen Patienten (<45 Jahren) sollte den Kliniker an eine hereditäre Disposition denken lassen.

Die molekulargenetische Untersuchung auch der scheinbar sporadischen CRC auf MSI kann einen Hinweis auf Defekte des MMR-Systems geben. Dieser Test ist bereits in vielen Labors etabliert. Es ist davon auszugehen, dass ein molekulargenetischer Test von Stuhlproben zur Früherkennung von Darmtumoren in naher Zukunft etabliert wird, der den Hämo-cult-Test ersetzen wird.

Die Kenntnis der molekulargenetischen Grundlagen der kolorektalen Tumorgenese ermöglicht die Entwicklung von neuen Präventions- und Therapiestrategien, bis hin zur Entwicklung eines Impfstoffs für Hochrisikopersonen. Diese interessanten und vielversprechenden Studien haben für die Praxis noch keine Relevanz; sie sollten jedoch weiter verfolgt werden, da sie in Zukunft eine Alternative zu der radikalen chirurgischen Therapie darstellen könnten.

Danksagung

Die Arbeiten zu hereditären kolorektalen Tumoren werden am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn von der Deutschen Krebshilfe unterstützt.

Literatur

Friedl W und Jungck M (1998) Familiäre adenomatöse Polyposis: Molekulargenetische Diagnostik und klinische Aspekte. *Med Genet* 10:266-270

Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahrenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P (2001) Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48:515-521

Graeven U und Schmiegel W (2000) Das Kolonkarzinom. Konsens der therapeutischen Strategien. *Internist* 41:876-885

Holinski-Feder E (1998) HNPCC-Syndrom. Hereditäres Nicht Polypöses Colorektales Carzinom. *Med Genet* 10:271-273

Kinzler KW und Vogelstein B (1997) Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386:761-762

Kinzler KW and Vogelstein B (1998) Colorectal Tumors. In: B Vogelstein and KW Kinzler (eds) *The Genetic Basis of Human Cancers*. McGraw-Hill, 565-587

Prix L, Uciechowski P, Böckmann B, Giesing M, Schuetz A (2002) Diagnostic biochip array for fast and sensitive detection of K-ras mutations in stool. *Clinical Chemistry* 48:428-435

Schulmann K und Schmiegel W (2002) Kolorektales Karzinom. In: D Ganten und K Ruckpaul (Hrsg) *Molekularmedizinische Grundlagen von nicht-hereditären Tumorerkrankungen*. Springer-Verlag Berlin – Heidelberg – New York 231-256

Schwarz RS (2002) A needle in a haystack of genes. *N Engl J Med* 346:302-304

Stephenson J (2000) Experimental colon cancer test appears to hold promise. *JAMA* 284 (20): 2584

Toribara NW and Sleisenger MH (1995) Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 332:861-867

Traverso G, Shuber A, Levin B, Johnson C, Olsson L, Schoetz DJ, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B (2002a) Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 346:311-320

Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B (2002b) Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 359(9304):403-4

Korrespondenzadresse

Dr. Waltraut Friedl
Institut für Humangenetik
des Universitätsklinikums Bonn
Wilhelmstraße 31
53111 Bonn
Tel. 0228-287-2334
Fax 0228-287-2380
waltraut.friedl@ukb.uni-bonn.de